anses
alimentation, environnement, travail

LE DIRECTEUR GENERAL

Maisons-Alfort, le 30 SEP. 2014

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande de renouvellement d'homologation de la préparation bactérienne pour soja RHIZOFLO SOJA, à base de *Bradyrhizobium japonicum*, de la société BASF AGRO S.A.S

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de matières fertilisantes et supports de culture.
Les avis formulés par l'Agence comprennent :
- *l'évaluation des risques sanitaires que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;*
- *l'évaluation de leur efficacité sur les végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;*
- *une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.*

PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Agence a accusé réception d'une demande de renouvellement d'homologation au titre des matières fertilisantes de l'inoculum bactérien RHIZOFLO SOJA de la société BASF AGRICULTURAL SPECIALITIES LTD, pour laquelle, conformément à l'article R.255-1-1 du Code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

Cette demande s'accompagne d'une demande de transfert (n° 2013-1694) de la société BECKER UNDERWOOD à la société BASF AGRO S.A.S et d'une demande de changement d'adresse du site de fabrication (n° 2014-0303).

Le produit RHIZOFLO SOJA bénéficie d'une homologation n° 1020021 pour un usage en enrobage semences de soja à raison de 400 ml d'inoculum pour 80 à 120 kg de graines. Selon les termes de l'autorisation en vigueur, ce produit est de la classe « Préparation bactérienne pour soja » et du type « Inoculum de *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 ».

Les éléments de suivi post-homologation requis étaient les suivants, conformément à la décision d'homologation datée du 30 juin 2006 :

Compléments requis	Délai accordé	Réponse	Commentaires de l'Anses
Résultats des analyses de contrôle semestriel portant sur les éléments d'étiquetage (souche bactérienne). Résultats d'une analyse microbiologique complète.	6 mois avant l'échéance de l'autorisation, lors de la demande de renouvellement d'homologation	Analyses de suivi de production réalisées par l'INRA de Dijon de chacun des lots commercialisés entre 2007 et 2013.	11 rapports de suivi de production ont été communiqués du fait de l'absence de production certaines années. Le dossier de demande de renouvellement d'homologation a été communiqué ultérieurement au délai réglementaire imparti.

L'ensemble des inoculants pour soja mis sur le marché a été contrôlé par l'INRA de Dijon. La richesse, la pureté et l'identité de la souche ont été déterminées. Les résultats révèlent une richesse en *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 conforme à la valeur minimale garantie pour l'ensemble des lots produits, ainsi qu'une absence de contaminants.

Le présent avis porte sur la préparation bactérienne liquide RHIZOFLO SOJA obtenue à partir d'un inoculant biologique à base de *Bradyrhizobium japonicum*, souche G49, conservé dans un milieu de culture approprié. La souche G49 est la seule souche de *B. japonicum* autorisée en France. Elle est contrôlée chaque année et mise à disposition des industriels par l'INRA de Dijon. Cette préparation bactérienne est destinée à la fixation de l'azote atmosphérique *via* la symbiose de la bactérie avec le soja.

Cet avis est fondé sur l'évaluation par l'Agence du dossier déposé à l'Anses pour cette préparation microbienne, conformément aux exigences du Code rural et de la pêche maritime, de l'arrêté du 21 décembre 1998 et du guide pour l'homologation des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (document cerfa 50644#01) et sous réserve de l'utilisation du produit dans le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA).

SYNTHESE DE L'EVALUATION

L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Agence et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Agence.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", réuni le 8 avril 2014, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

CONSIDERANT L'IDENTITE DE LA PREPARATION BACTERIENNE

Les caractéristiques garanties de l'inoculum sont les suivantes (sur produit brut) :

Caractéristiques	Valeurs garanties selon la décision d'autorisation de mise sur le marché	Valeurs garanties selon la déclaration du pétitionnaire
Nom de la souche	*Bradyrhizobium japonicum* G49	
Nombre de germes	minimum 1.10^9 par mL	

L'inoculum bactérien est proposé pour une utilisation en enrobage de semences de soja. Il se présente sous la forme d'un sachet stérile contenant une suspension de *Bradyrhizobium japonicum* prête à l'emploi (sachet de 400 mL pour 80 à 120 kg de semences, correspondant à un hectare de culture de soja).

Usage et conditions d'emploi demandés dans le cadre du renouvellement de l'homologation (formulaire cerfa n° 11385 du 29 janvier 2014) :

Culture	Dose par apport (en mL d'inoculum.ha^{-1})	Nombre de germes (par ha)	Nombre d'apport par an	Epoque d'apport
Soja	363 à 545	$3,63.10^{11}$ à $5,45.10^{11}$	1	Semis

La dose maximale d'apport prise en compte pour l'évaluation de l'innocuité du produit est de 545 g par hectare et par an (densité de la suspension = 1).

CONSIDERANT LE MODE DE FABRICATION DE LA PREPARATION BACTERIENNE ET LA QUALITE DE LA PRODUCTION

Caractérisation de la préparation bactérienne et procédé de fabrication

Les spécifications de la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA telles que décrites sur le formulaire cerfa 11385 (arrêté du 21/12/98, annexe I) et la fiche d'information sont conformes aux exigences réglementaires.

Le procédé de fabrication reste inchangé depuis l'autorisation de mise sur le marché initiale du produit RHIZOFLO SOJA. Par conséquent, il n'a pas été réévalué dans le cadre de la présente demande de renouvellement d'homologation. Il s'agit d'une culture de bactéries en fermenteur. Chaque lot de commercialisation correspond à un sachet de 400 mL de culture bactérienne en suspension.
Le système de management de la qualité de la fabrication est décrit de manière satisfaisante. Les souches de *Bradyrhizobium japonicum* G49 sont vérifiées chaque année quant à leur pureté, leur richesse en colonies et leurs propriétés de nodulation et de fixation d'azote par le l'INRA de Dijon (Unité Mixte de Recherche Agroécologie, pôle de Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire).

Par ailleurs, chaque lot commercialisé est contrôlé conformément aux requis de la décision d'homologation. La vérification des inoculums avant commercialisation porte sur l'identification de la souche, leur richesse et leur pureté microbiologique (absence de contaminants décelables).
Le demandeur précise que les conditions de qualité requises pour qu'un lot soit commercialisable sont d'être fabriqué avec la souche G49, d'avoir une richesse en *Bradyrhizobium japonicum* revivifiables au moins égale à 4.10^{11} par dose et d'être exempt de contaminants décelables.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources de matières premières indiquées dans le dossier technique pour lesquelles ces documents sont requis. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.

La souche *Bradyrhizobium japonicum* G49 n'est pas manipulée génétiquement. Cette souche isolée en Inde, est inscrite à la Collection Microorganismes d'Intérêt AgroEnvironnemental (MIAE) de l'Unité Mixte de Recherche Agroécologie à l'INRA de Dijon.

Par ailleurs, les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de dangers physico-chimiques particuliers.

Constance de composition de la préparation bactérienne

L'étude de l'homogénéité de la préparation RHIZOFLO SOJA n'est pas nécessaire : il s'agit d'une culture bactérienne en suspension.

Par ailleurs, la constance de composition de la préparation bactérienne relative à sa richesse en germes est convenablement établie pour l'invariance et la stabilité. Tous les lots analysés présentent une richesse en *Bradyrhizobium japonicum* supérieure aux exigences de l'homologation (minimum 4.10^{11} par sachet). Toutefois, alors que la fiche d'information du produit précise une durée de conservation de 24 mois entre 4 et 25°C, à l'abri de la lumière directe du soleil, les données disponibles permettent d'assurer la stabilité du produit sur une période de conservation maximale limitée à 9 mois. Il est également indiqué que tout sachet ouvert doit être utilisé dans un délai de 6 heures.

Aussi, au regard des données de l'étude de stabilité, la durée maximale de stockage de la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA par l'utilisateur devra être ramenée à 9 mois.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

Les méthodes d'échantillonnage (constitution des échantillons et mode de prélèvement) en vue des analyses et essais du présent dossier ne sont pas décrites. Cette absence de description est néanmoins considérée comme non préjudiciable dans le cas de la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA.

L'analyse de caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'inoculum bactérien a été effectuée par un laboratoire accrédité sur le programme 108.

Les analyses relatives aux contrôles de la souche bactérienne et des inoculums ont été réalisées par l'INRA de Dijon (Unité Mixte de Recherche Agroécologie, pôle de Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire).

La souche *Bradyrhizobium japonicum* G49 est identifiée en réalisant l'hybridation du profil de restriction de l'ADN[1] complet des bactéries avec une sonde contenant la séquence répétée Rsα décrite par Kaluza *et al.* (1986). La méthode est publiée[2] et utilise l'enzyme de restriction XhoI. Cependant, aucun rapport d'analyse n'a été communiqué à l'appui de cette identification de la souche. Un rapport complet (protocole, ensemble des résultats, discussion/comparaison et conclusion) est donc nécessaire pour valider la caractérisation de la souche.

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation du produit aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être exploités de manière systématique.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'INNOCUITE DE LA PREPARATION BACTERIENNE

Matières premières et procédé de fabrication

L'espèce *Bradyrhizobium japonicum* n'est pas pathogène pour l'homme ou l'animal. Elle n'est pas inscrite sur la liste à l'annexe III de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail.
Selon un rapport de l'OCDE[3] consacré à la sécurité relative à l'utilisation des microorganismes en tant que biofertilisants, de rares cas d'allergie ont été signalés en présence de grande quantité de *Rhizobium*.

La souche G49 est la seule souche de *B. japonicum* autorisée en France. *Bradyrhizobium japonicum* est un symbiote non strict, c'est-à-dire que ce microorganisme peut survivre dans le sol en l'absence de plante hôte. Les *Rhizobium sp.* ont un potentiel de persistance à long terme dans les sols et peuvent entrer en compétition avec les microorganismes indigènes. Néanmoins, les éléments bibliographiques indiquent que la population introduite persiste dans une faible proportion et, ainsi, la population indigène retrouve son niveau initial (OCDE, 1995).

La composition du substrat de fermentation utilisé pour la culture des bactéries n'est pas décrite.

Etude toxicologique de la préparation

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) permettent de respecter les critères d'innocuité pour l'homologation des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.

Par ailleurs, les données microbiologiques disponibles montrent que la préparation bactérienne respecte les critères en vigueur pour l'homologation. Cependant, il convient de noter une forte teneur du produit en levures et moisissures.

Aucun essai de toxicologie réalisé sur le produit n'a été communiqué. Cependant, la souche G49 contenue dans la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA est utilisée depuis plusieurs décennies en France sans qu'aucun effet délétère chez l'homme ou l'animal n'ait été rapporté. De même, les autres composants du produit ne sont pas de nature à engendrer un risque pour l'homme ou l'animal.

---

[1] ADN = Acide DésoxyriboNucléique
[2] Hartmann A. (1989). Caractérisation du génome de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* au niveau moléculaire et son utilisation en écologie microbienne : diversité des populations naturelles, potentiel de transfert de plasmides. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne. Kaluza K. *et al.* (1986). J. Bacteriol., 162 : 535-542.
[3] OCDE = Organisation de Coopération et de Développement.

Au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008[4], aucune classification toxicologique n'est requise pour la préparation bactérienne. Néanmoins, s'agissant d'une matière fertilisante à base de microorganismes, la phrase de précaution « Contient *Bradyrhizobium japonicum*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit être mentionnée sur l'étiquette.

Par ailleurs, un masque anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), des gants et un vêtement de protection appropriés devront être portés pendant toutes les phases du traitement des semences.

Résidus et sécurité du consommateur

Compte tenu de la nature de la matière fertilisante et de l'usage revendiqué, il n'est pas attendu de risque pour le consommateur.

Devenir dans l'environnement et écotoxicité de la préparation bactérienne

Aucun test d'écotoxicité ni aucun essai visant à mesurer l'impact environnemental du produit RHIZOFLO SOJA n'a été effectué. Toutefois, la nature des matières premières et du procédé de fabrication ainsi que les données bibliographiques sur le devenir des *Rhizobium sp.* dans l'environnement sont en faveur d'un impact à court terme acceptable sur l'environnement.

En outre, compte tenu de l'usage du produit (traitement de semences), le transfert de la souche G49 vers les milieux aquatiques n'est pas attendu. Son impact à court terme sur l'environnement est considéré comme acceptable.

La classification environnementale proposée pour la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA, au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008, est « non classé ».

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'EFFICACITE DE LA PREPARATION BACTERIENNE

Caractéristiques biologiques de la préparation bactérienne

Effet revendiqué

L'intérêt agronomique de la préparation RHIZOFLO SOJA concerne la fixation de l'azote atmosphérique par symbiose entre les bactéries *Bradyrhizobium japonicum* et le soja (formulaire cerfa n° 11385 du 29 janvier 2014).

Eléments relatifs à l'efficacité intrinsèque et au mode d'action des Rhizobium

Le mode d'action des bactéries est bien établi et repose sur l'existence effective d'une symbiose entre les bactéries du genre *Rhizobium* et les Fabacées, dont fait partie le soja.

Cette symbiose est permise grâce à la colonisation du système racinaire du soja par la bactérie *Bradyrhizobium japonicum* et la formation de nodosités, véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et les plantes. Les bactéries fixent et réduisent l'azote atmosphérique en ammonium, directement assimilable par les plantes hôtes. En échange, les Fabacées leur procurent un apport en substrats carbonés issus de la photosynthèse.

Aussi, la fixation symbiotique de l'azote de l'air permet une réduction des apports d'azote tout en obtenant un rendement supérieur à celui d'une parcelle non inoculée.

Le pétitionnaire souligne que la formulation du produit permet de maintenir une forte concentration de bactéries viables en surface des semences après inoculation. L'efficacité de la nodulation ainsi que des rendements élevés sont ainsi assurés.

[4] Règlement (CE) n° 1272/2008 = Règlement du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

Essais d'efficacité

Dans le cadre de la demande de renouvellement de l'homologation, le pétitionnaire présente deux nouveaux essais conduits par l'INRA de Dijon en 2012 et 2013. La qualité de la nodulation ainsi que l'efficacité de l'inoculant au champ ont été contrôlées sur deux variétés de soja.

Dans le premier essai, les graines de soja ont été enrobées avec le produit RHIZOFLO SOJA soit au moment de leur semis, soit 48 heures avant le semis. L'efficacité de nodulation du produit RHIZOFLO SOJA n'a pas été altérée par le délai 48 heures entre l'inoculation et le semis des graines. Ainsi, les deux modalités traitées avec le produit ne sont pas significativement différentes sur l'ensemble des critères agronomiques mesurés. En outre, dans les deux essais mis en œuvre, l'inoculation des graines de soja conduit à la formation de nodosités sur les racines des plantes et améliore significativement l'intensité de la couleur des parties aériennes et le rendement net en graines des plantes par rapport au témoin.

Par ailleurs, l'efficacité de *Bradyrhizobium japonicum* pour la fixation de l'azote atmosphérique par le soja est avérée et reconnue.

Conclusions sur le mode d'emploi du produit

Le mode d'emploi indiqué est suffisant pour permettre une bonne utilisation du produit.

Tout sachet ouvert doit être utilisé dans les 6 heures et les graines de soja doivent être semées dans un délai de 24 heures après l'inoculation.

Le demandeur précise que la préparation RHIZOFLO SOJA ne doit pas être mélangé avec des préparations phytosanitaires.

Revendications retenues

La revendication présentée par le pétitionnaire relative à la fixation de l'azote atmosphérique est considérée comme soutenue.

Une nouvelle dénomination de classe et de type est proposée : « Préparation bactérienne pour soja » - « Inoculum liquide de *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 pour enrobage de semences de soja ».

CONCLUSIONS

En se fondant sur les données soumises par le pétitionnaire et évaluées dans le cadre de cette demande, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

A. La caractérisation de la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA est établie de manière satisfaisante. Elle devra toutefois être complétée par la fourniture du rapport d'analyse permettant de justifier l'identification du microorganisme au niveau de la souche. L'homogénéité et l'invariance de la préparation sont également établies.

L'élément de caractérisation retenu pour le marquage obligatoire est le dénombrement des germes de l'inoculum. En outre, le genre, l'espèce et la souche du microorganisme, ainsi que la date limite d'utilisation optimale de la préparation devront être précisés sur l'étiquette.

Au regard des données de l'étude de stabilité, la durée de stockage chez l'utilisateur ne devra pas excéder 9 mois dans les conditions spécifiées par le demandeur (température inférieure à 25°C, à l'abri de la lumière directe du soleil).

B. L'innocuité de la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA pour l'usage demandé est considérée comme conforme aux exigences réglementaires.

Classification de la préparation bactérienne, phrases de risque et conseils de prudence

La préparation bactérienne est « non classé » au sens du Règlement (CE) n° 1272/2008.

Précautions d'emploi

La mention « Contient B*radyrhizobium japonicum*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit être affichée sur l'étiquette.

Port d'un masque anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), de gants et vêtements de protection appropriés par l'utilisateur pendant toutes les phases du traitement de semences.

C. L'efficacité de la préparation bactérienne RHIZOFLO SOJA est avérée et reconnue. En formant des nodosités sur les racines du soja, la symbiose est mise en place et conduit, en particulier, à l'amélioration du rendement en graines des plantes.

La nouvelle dénomination de classe et de type proposée est : « Préparation bactérienne pour soja » - « Inoculum liquide de *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 pour enrobage de semences de soja ».

Usage et conditions d'emploi retenus

Culture	Dose par apport* (en mL d'inoculum.ha^{-1})	Nombre de germes (par ha)	Epoque et mode d'apport
Soja	400	minimum 4.10^{11} ufc**	Inoculation des semences (enrobage) avant le semis

* un sachet dose de 400 mL pour 80 à 120 kg de semences, correspondant à un hectare de culture de soja
** unités formant colonie

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet un avis **favorable** à la mise sur le marché de la préparation bactérienne pour soja RHIZOFLO SOJA et propose un renouvellement d'homologation dans les conditions d'étiquetage et d'emploi précisées ci-dessus.

Données post-autorisation

Les compléments d'information suivants devront être apportés au plus tard 6 mois avant l'échéance de l'autorisation de mise sur le marché, sauf indications contraires précisées ci-dessous :

Type	Compléments post-homologation requis
Analyses	Effectuer au moins tous les six mois, sur des échantillons représentatifs de la matière fertilisante telle qu'elle est mise sur le marché et selon les méthodes prévues par le programme COFRAC 108 ou spécifiées ci-après, des analyses portant au moins sur : - les éléments figurant sur l'étiquetage (dénombrement des germes) ; - les éléments traces métalliques As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn ; - les microorganismes totaux, Entérocoques, *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, Nématodes, Levures et moisissures, *Aspergillus, Pythium* (méthodes prévues par le guide pour l'homologation). **Dans un délai de 2 ans**, fournir le rapport d'analyse complet (protocole, ensemble des résultats, discussion/comparaison et conclusion) permettant de justifier la caractérisation, au niveau de la souche, du microorganisme composant la préparation bactérienne.

	Les analyses doivent avoir été effectuées par un laboratoire accrédité par le COFRAC sur le programme 108 ou par un organisme équivalent (norme NF ISO 17025). Les méthodes d'analyse doivent être en priorité celles du programme 108 du COFRAC. L'emploi de toute autre méthode doit être justifié et il convient d'utiliser en priorité les méthodes normalisées ou standardisées. Le cas échéant, fournir la méthode utilisée, sa justification ainsi que les éléments nécessaires à sa validation. Dans tous les cas, les références des méthodes employées doivent être précisées.
Procédé	**Dans un délai de 2 ans**, fournir la composition du milieu de culture de la préparation bactérienne.

Marc MORTUREUX

Mots-clés : RHIZOFLO SOJA - *Bradyrhizobium japonicum* souche G49 - enrobage de semences - soja - FRES